d'être examinée. Le projet actuel génère une situation particulièrement favorable à son examen et il nous paraît, dès lors, opportun d'ajouter ce volet investigationel au projet. Nous proposons d'étudier, à divers moments de l'étude, (avant chimiothérapie, en aplasie avant facteurs de croissance, après IL-3, après G-CSF, et après retour à l'état de base), les cellules souches pluripotentes dont le maintien doit assurer la perpétuation de l'hématopoièse pendant toute la vie. Nous utiliserons la technique des Pre-CFU ou Delta CFU (7) qui est probablement la seule à même d'approcher, chez l'humain la cellule souche pluripotente capable d'autorenouvellement. La méthode nous permettra d'évaluer le nombre de ces cellules et leur capacité de prolifération.
Ce projet comporte les frais inhérents aux méthodes de culture et à l'usage des facteurs de croissance.

REFERENCES

1. HUMBLET Y, SYMANN M. et al.
Late intensification chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in selected small cell carcinoma of the lung : a randomized study.
J. Clin. Oncol. 1987; 5:1864-1873.

2. COIFFIER B. ET BOSLY A.
NH-84 regimen : a multicenter study of intensive chemotherapy in 737 patients with aggressive malignant lymphoma.
J. Clin. Oncol. 7: n°8:1018-1026, 1989.

3. EDER JP, ELIAS A, SHEA TC, SCHRYBER SM, TEICHER BA, HUNT M, BURKE J, SIEGEL R, SCHNIPPER LE, FREI III E, ANTMAN K.
A phase I-II study of cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin with autologous bone marrow transplantation in solid tumor patients.
J. Clin. Oncol. 8 (7) 1239-1245, 1990.

4. KESSINGER ET AL.
The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high dose therapy for malignancies.
Blood, 1991 ; 77: 211-213

5. TARELLA C, GIANNI ET AL.
Peripheral blood expansion of early progenitor cells after high dose cyclophosphamide and rh GM-CSF.
Eur. J. Cancer 1991; 27:22-27.

6. SHERIDAN WP, BEGLEY CG, JUTTNER CA, SZER J, TO LB, MAHER D, MCGRAFTH KM, MORSTYN G, FOX RM.
Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy.
Lancet, 339:640, 1992

7. SMITH C, GASPARETTO C, COLLINS N, GILLIO A, MUENCH M, O'REILLY J, MOORE MAS.
Purification and partial character of a human hematopoietic precursor population.
Blood. 77 (10):2122-2128, 1991.

20215156B7

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

Divers schémas d'administration de facteurs de croissance ont été utilisés :

- Interleukine-3 (7,5 µg/kg/j) associé au GM-CSF (3 ou 5 µg/kg/j) ou au G-CSF (5 ou 12 µg/kg/j).
- GM-CSF seul (5 µg/kg/j)
- G-CSF seul (5 µg/kg/j)

Ces facteurs ont été administrés dans le décours ou à distance de la chimiothérapie. La cinétique de mobilisation des cellules souches hématopoiétiques a été suivie par mise en culture et marquage phénotypique. Les résultats préléminaires sont encourageants :

1. Les facteurs de croissance administrés de façon combinée ou isolée permettent une récolte abondante de cellules souches dans le sang périphérique. Cette récolte est plus importante lorsque les facteurs de croissance sont administrés dans le décours de la chimiothérapie : les taux moyens (+/- SEM) de CFU-GM/kg récoltés par 2 leukaphérèses chez 6 patients traités par une combinaison d'IL-3 et de GM-CSF à distance de la chimiothérapie étaient de 43.426 +/- 20.012 alors que les taux correspondants chez 2 patients traités de la même façon dans le décours immédiat de la chimiothérapie étaient de 523.369 et 4034 CFU-GM/kg (Figure 1).

2. La quantification des CFU-GM par cytofluorométrie en flux après marquage phénotypique (CD34, Ac monoclonal HPCAII de Becton-Dickinson) est corrélée de façon significative à la quantification des colonies dérivées de ces cellules (CFU-GM) en culture (r = 0,69, p = 0,005).

3. Les premiers résultats de la reprise hématopoiétique après greffe sont encourageants : à la fois la reprise de la neutropoièse et de la thrombopoièse semblent accélérée après greffe de cellules souches périphériques associées ou non (1 patient) aux cellules médullaires, comparativement aux résultats de moelle uniquement.

JUSTIFICATION DE LA DEMANDE D'AVENANT

A) Cependant, la mise au point de techniques de quantification des CSH et l'homogénéisation nécéssaire des matériels utilisés dans les trois centres universitaires impliqués dans ce protocole entraîne un surcoût par rapport aux estimations initiales des frais.

- La standardisation des méthodes de culture de CFU-GM selon les méthodes internationales nécéssite l'utilisation de facteurs de croissance (IL-3, GM-CSF, Stem Cell Factor) dont le coût en routine est élevé.

- Par ailleurs, après greffe des CSH périphériques, la reprise plaquettaire semble davantage accélérée que celle des neutrophiles (6). L'explication de cette reprise accélérée nécéssite une quantification précise des précurseurs mégacaryocytaires par mise en culture et marquage par anticorps monoclonal. Ces méthodes de quantification différentes de celles des CFU-GM n'ont pas encore été mises au point : l'optimalisation des milieux de culture par utilisation de facteurs de croissance hématopoiétiques (IL-3, IL-6, IL-11, SCF) et le marquage par anticorps monoclonal des glycoprotéines de membrane (GPIIbIIIa) afin de distinguer ces colonies par cytofluorométrie en flux sont nécéssaires. Ces deux nouvelles méthodes de mesure sont coûteuses en raison de l'utilisation de facteurs de croissance, d'anticorps monoclonal et du matériel de cytofluorométrie en flux qui permet la quantification des colonies.

B) Par ailleurs, le projet comporte un stimulation importante, délibérée de l'hématopoièse à titre thérapeutique. Cette stimulation comporte d'abord le rebond qui suit une aplasie chimio-induite et est ensuite renforcée par l'administration de 2 facteurs de croissance. A court terme ce procédé a déjà démontré son efficacité thérapeutique dans l'autogreffe. Néanmoins, la question est posée quant à l'inocuité du procédé : existe-t-il un risque d'épuisement médullaire à long terme ? Cette question importante mérite

2021515688

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES DU SANG PERIPHERIQUE: QUANTIFICATION DES PROGENITEURS HEMATOPOIETIQUES - MOBILISATION AVANT CYTAPHERESE - BENEFICE SUR LA REPRISE HEMATOPOIETIQUE ET IMMUNITAIRE.

POSITION DU PROBLEME ET BUT DU TRAVAIL :

Le pronostic de nombreuses tumeurs solides agressives est actuellement amélioré par la chimiothérapie intensive associée ou non à la radiothérapie (1,2,3).

Cette escalade des traitements essentiellement myélotoxiques nécéssite l'association d'une greffe de cellules souches hématopoiétiques (CSH), préalablement prélevées chez le patient. L'autogreffe de CSH permet de réduire, sans la supprimer, la période dangereuse de la myélosupression. On peut espérer que l'optimalisation de cette procédure en réduise la mortalité et la morbidité attenantes encore trop élevées et améliore les premiers résultats, déjà prometteurs.

Un projet interuniversitaire, introduit à ce sujet dans le cadre du Télévie 1992 (n° 7.4583.92), est en cours de réalisation. Ce dossier est en fait une demande d'avenant au projet sus-cité.

Les CSH mobilisées et prélevées à partir du sang périphérique présentent certains avantages sur les cellules médullaires :

1. prélèvement moins invasif.
2. possibilité de récolte suffisante de cellules souches même après hémipelvectomie ou irradiation du bassin.
3. reprise hématopoiétique accélérée après greffe (4,5).

Les modalités d'obtention et de prélèvement de ces CSH périphériques doivent cependant encore être précisées, à savoir:

1. le schéma de mobilisation permettant la meilleure récolte de cellules souches d'un point de vue quantitatif et qualitatif : facteurs de croissance combinés entre eux ou non, associés ou non à la chimiothérapie.
2. Le moment idéal de prélèvement de ces cellules par leucaphérèse, établi en fonction des résultats obtenus lors de cycles identiques de mobilisation.
3. la méthode idéale de quantification des CSH (CFU-GM) soit par marquage phénotypique à l'aide d'anticorps monoclonaux (rapide et facile à standardiser), soit par culture (qui apporte des informations fonctionnelles).

En définitive, la meilleure appréciation de la qualité de la procédure de mobilisation et de récolte des cellules souches périphériques se fera par l'étude de la cinétique de reprise hématopoiétique après greffe, en la comparant aux résultats de reprise hématopoiétique après greffe de cellules médullaires. La reconstitution immunitaire, d'intérêt capital également, sera étudiée dans le cadre d'autres projets du laboratoire introduits au F.N.R.S..

RESULTATS PRELIMINAIRES :

Depuis 1992, 25 patients atteints de cancer de mauvais pronostic (lymphome non Hodgkinien, cancer du sein métastasé, tumeur germinale métastasée, cancer bronchique anaplasique à petites cellules) ont été inclus dans un protocole clinique pilote. Ces candidats à une intensification thérapeutique avec autogreffe de CSH

et au passé chimiothérapeutique variable, ont reçu, après une cure de chimiothérapie conventionnelle, des facteurs de croissance hématopoiétiques (par voie sous-cutanée) en vue de mobiliser les cellules souches périphériques. Celles-ci ont été récoltées par leucaphérèse (7 litres de sang traités par séance) en fin de traitement aux facteurs de croissance. Certains patients ont bénéficié de 2 cycles de stimulation afin d'augmenter la récolte de CSH périphériques.

2021515689

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

ROLE DE L'ACTINE ET DES PROTEINES DU CYTOSQUELETTE DANS LA DIFFERENCIATION MEGACARYOCYTAIRE DES AFFECTIONS MALIGNES DE LA MOELLE OSSEUSE

La production des plaquettes sanguines, la mégacaryocytopoïèse, est l'aboutissement d'une prolifération et d'une différentiation de progéniteurs médullaires (les cellules souches) donnant naissance à des précurseurs polyploïdes (les mégacaryocytes) dont le cytoplasme, après maturation, se fragmente en plaquettes [1]. Le contrôle de la mégacaryocytopoïèse est assuré par des facteurs de croissance exerçant une action stimulante ou inhibitrice sur cette hiérarchie de cellules [2].

Au moment où les auteurs pensaient que ce contrôle s'effectuait sur les cellules-souches, nous avons démontré chez l'animal d'expérience que la stimulation de la prolifération des **cellules souches** mégacaryocytaires par le lithium n'est pas due à un effet direct de ces molécules mais bien à la sécrétion de facteurs de croissance par les lymphocytes T [3]. La sécrétion d'acétylcholinestérase par les mégacaryocytes des rongeurs modifie la concentration de l'acétylcholine, un neuromédiateur, et pourrait dès lors jouer un rôle dans la régulation de la production plaquettaire. Cependant, nous avons montré que la stimulation des **cellules-souches** par les agents cholinergiques découle, comme pour le lithium, d'une augmentation de la production de cytokines non spécifiques par les lymphocytes T [4].

Aussi, nos efforts se sont logiquement concentrés sur le phénomène de polyploïdisation mégacaryocytaire. Par notre méthode de mesure du contenu en ADN des mégacaryocytes obtenus en culture de moelle osseuse, nous avons confirmé que l'accroissement de la production plaquettaire suite à l'augmentation des besoins en plaquettes ne s'effectue pas au niveau des **cellules-souches** mais bien à partir des **mégacaryocytes** dont le niveau de ploïdie est proportionnel aux besoins en plaquettes de l'organisme [5]. Notre technique nous a aussi permis de découvrir un progéniteur mégacaryocytaire de faible densité (Light-Density Colony-Forming-Unit Megakaryocyte; LD-CFU-M) dont la probabilité de **polyploïdisation** est plus grande que celle des autres cellules-souches [6].

Dès lors, convaincus de l'importance de la polyploïdisation, nous avons essayé de comprendre ce mécanisme et démontré que l'inhibition de la polymérisation de l'**actine**, une protéine de structure du cytoplasme, entraîne la polyploïdisation mégacaryocytaire qui permet une augmentation de la production plaquettaire [7].

Notre projet a pour but de poursuivre l'étude du mécanisme par lequel la modification de polymérisation de l'actine entraîne la polyploïdisation mégacaryocytaire et d'identifier le désordre de ce mécanisme dans les cancers de la moelle osseuse.

1. Chatelain C, Baatout S: Regulation of megakaryocytopoiesis, in "Haematopoietic Growth Factors : From the Basic to Clinical Applications" (Symann M, Quesenberry P, Morstyn G Eds). Gardiner-Caldwell Communications LTD, Cheshire, United Kingdom), pp. 35-44, 1992.
2. Chatelain C, Guillaume T, Symann M: Regulation of megakaryocyte and platelet production. Focus on growth factors 3:1, 1992
3. Chatelain C, Burstein SA, Harker LA: Lithium enhancement of megakaryocytopoiesis in culture: mediation via accessory marrow cells. Blood 62:172, 1983
4. Chatelain C, Hamood M, De Bast M, Symann M: Cholinergic enhancement of megakaryocytopoiesis and granulocytopoiesis in culture: mediation via T-lymphocytes. Exp Hematol 17:1067, 1989
5. Chatelain C, Burstein SA: Fluorescence cytophotometric analysis of megakaryocytic ploidy in culture: studies of normal and thrombocytopenic mice. Blood 64:1193, 1984
6. Chatelain C, De Bast M, Symann M: Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M). Blood 72:1187, 1988
7. Chatelain C, De Bast M, Symann M: Enhancement of megakaryocyte polyploidization by actin inhibition. Blood 80:497a, 1992 (abstr.)

2021515690

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

I. INTRODUCTION.

Les affections malignes de la moelle osseuse se caractérisent par des anomalies de prolifération et de maturation des cellules souches à l'origine des trois lignées des cellules sanguines. La lignée des plaquettes sanguines est issue de cellules de la moelle osseuse, les mégacaryocytes. Ceux-ci tiennent leur nom de la taille importante de leurs noyaux suite à l'acquisition d'un matériel nucléaire polyploïde au cours de la maturation. Dans les leucémies, cancers de la moelle osseuse, les anomalies de la maturation et de la polyploïdisation mégacaryocytaires ainsi que l'action de la chimiothérapie expliquent l'absence de plaquettes fonctionnelles. Comme les plaquettes sanguines sont responsables de l'hémostase primaire, ces patients leucémiques présentent des hémorragies parfois incontrôlables.

La polyploïdisation (endomitose ou endoréduplication) est la règle dans la différenciation normale des mégacaryocytes. Son accentuation assure une augmentation de la production plaquettaire en cas de besoin. En effet, la taille des mégacaryocytes et leur ploïdie augmentent 24 à 48 heures après l'induction d'une thrombopénie chez l'animal. En revanche, l'augmentation provoquée du nombre des plaquettes, par transfusion par exemple, entraîne la diminution de la ploïdie mégacaryocytaire. Il semble que plusieurs substances humorales (IL-6, LIF, IL-11,...) collectivement appelées "thrombopoïétine" exercent une régulation de ce phénomène.

Le mécanisme par lequel s'opère le choix entre la mitose classique et la polyploïdisation est totalement inconnu. Un asynchronisme entre les cinétiques de division nucléaire et cytoplasmique a été invoqué par la plupart des études. Nous avons démontré qu'en conditions contrôlées et stables (cultures de cellules), la cinétique de division nucléaire n'est pas affectée par le type de division mégacaryocytaire (mitose classique ou endomitose). Dès lors, nous avons réfuté l'hypothèse d'une modification de la cinétique de division du noyau dans l'induction du mécanisme de polyploïdisation mégacaryocytaire (1). Les expériences de Paulus, que nous avons confirmées, ont permis d'identifier trois classes de cellules souches mégacaryocytaires en fonction de leurs probabilités (20, 40 et 80%) de quitter la mitose normale pour se polyploïdiser (2,1). Ces travaux ont aussi démontré que les progéniteurs megakaryocytaires diploïdes ont une probabilité stable d'entrer en endomitose durant plusieurs divisions et que celle-ci change au cours d'une seule mitose. Cela suggère que la polyploïdisation mégacaryocytaire résulte de l'altération soudaine d'un mécanisme biochimique impliqué dans la mitose et dont l'action majeure se développe dans le cytoplasme ou la membrane. Grâce à la méthode de mesure de la ploïdie mégacaryocytaire que nous avons développée (3), nous avons isolé et caractérisé un progéniteur mégacaryocytaire de faible densité (LD-CFU-M) dont les probabilités de polyploïdisation sont limitées à deux classes (4). Ces expériences confortent notre hypothèse d'une modification d'un composant cytoplasmique ou membranaire dans l'endomitose.

La séparation cytoplasmique ou cytodiérèse qui termine la mitose normale n'a pas lieu au cours de l'endomitose. La cytodiérèse débute par la contraction d'un anneau sous-membranaire d'actine-myosine. L'actine, la myosine, et la tubuline sont les composants principaux de la structure de soutien et de motilité de la cellule et forment le cytosquelette. Nous avons donc postulé que les protéines du cytosquelette, composants cytoplasmiques et membranaires, sont responsables de la polyploïdisation. Il est vrai que des cellules embryonnaires de nématodes ont été rendues polyploïdes par inhibition de la formation de l'anneau d'actine-myosine (5). Par ailleurs, le fuseau de tubuline détermine le plan de clivage cellulaire et donc l'orientation de l'anneau d'actine-myosine (6,7).

2021515691

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

Récemment, nous avons montré chez la souris, que la cytochalasine B, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, ajoutée aux cultures des progéniteurs mégacaryocytaires augmentait la ploïdie moyenne des mégacaryocytes au sein des colonies (8). Par contre, la colchicine, un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline n'a pas cet effet. Les techniques de mesure de la ploïdie mégacaryocytaire en culture ne donnent pas de résultats reproductibles chez l'homme. Aussi nous avons adopté et modifié une méthode de cytofluorométrie en flux de la ploïdie mégacaryocytaire pour étudier des lignées de cellules cancéreuses à caractère mégacaryocytaire. L'addition d'esters de phorbol (stimulants non spécifiques) et/ou de cytochalasine B (inhibiteur de la polymérisation de l'actine) aux milieux de culture de certaines lignées humaines (DAMI, HEL, K 562 et MEG 01), entraînent une augmentation significative de l'endomitose mégacaryocytaire. Il semble donc que l'absence de polymérisation de l'actine soit nécessaire à l'augmentation de ploïdie des mégacaryocytes. Ceci pourrait être expliqué par l'absence de formation en télophase de l'anneau contractile d'actine-myosine qui mène habituellement à la séparation cytoplasmique. Comme la concentration de l'actine au sein de la cellule est constante, il est évident qu'au cours de la division cellulaire, la synthèse d'actine nouvelle au sein d'une cellule est un phénomène contrôlé.

Comment envisager le rôle de l'actine dans le phénomène de polyploïdisation? Nous savons que les esters de phorbols (en particulier, le phorbol myristate acétate ou PMA) agissent sur la cellule en stimulant des récepteurs de manière non spécifique. L'activation de ces récepteurs dont le cytosquelette est partie intégrante peut amener diverses réactions inhibitrices ou stimulantes au sein de la cellule. Comme la réponse de la cellule suite à l'action du PMA n'est pas aussi importante que celle produite par la cytochalasine B, nous pensons que l'augmentation de ploïdie par la cytochalasine B doit être expliquée par l'action maximale sur un mécanisme effecteur terminal partiellement modulable par les récepteurs aux diverses cytokines.

Par quel mécanisme, le besoin accru en plaquettes et dès lors l'engagement dans le phénomène de polyploïdisation mégacaryocytaire peuvent mener à la diminution de polymérisation de l'actine? Tout d'abord, l'expression génique de l'actine, si elle est contrôlée devrait logiquement dépendre du produit final sous l'une ou l'autre de ses formes (actine G et/ou actine F). Toute modification d'un des composants (actine F) pourrait modifier la synthèse finale d'actine. Ensuite, la thymosine B4 a la propriété de séquestrer la majorité de l'actine G soluble (9). Elle peut donc moduler l'équilibre entre formes soluble et polymérisée de l'actine qui serait responsable du maintien d'une division mitotique normale. Enfin, le type particulier de polymérisation de l'actine pourrait aussi intervenir dans ce phénomène. En effet, la polymérisation peut être schématisée comme une lente progression d'une extrémité (arrow) du filament d'actine F où les monomères d'actine viennent se lier par rapport à l'autre extrémité (tail) dont les monomères d'actine se détachent. Donc, avec un équilibre F/G conservé, le type chimique d'actine peut encore être chimiquement modifié par ce processus dynamique au sein de la molécule déjà polymérisée.

II. BUT DU TRAVAIL.

Notre projet a pour but d'une part de préciser le mécanisme par lequel la modification de polymérisation de l'actine dans le cytoplasme engendre l'endomitose mégacaryocytaire et d'autre part de déceler, dans certains cancers de la moelle osseuse où la mégacaryocytopoïèse est déficiente, les anomalies du métabolisme des protéines du cytosquelette.

2021515692

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

III. APPROCHE EXPERIMENTALE.

A. ETABLISSEMENT DE LIGNEES MEGACARYOCYTAIRES HUMAINES.

Nous avons pu obtenir des lignées continues de cellules mégacaryocytaires leucémiques (DAMI, MEG01, HEL, K562). Notre laboratoire a développé quatre nouvelles lignées à partir d'affections malignes de la moelle osseuse (2 de Leucémie Myéloïde Chronique et deux de Thrombocytémie Essentielle). Ces lignées doivent encore être caractérisées. En particulier, leurs quantités mégacaryocytaires (expression des glycoprotéines IIb/IIIa et Ib) à l'état basal et après stimulation par PMA seront étudiées par cytofluorométrie en flux.

B. ETUDE DE LA CONCENTRATION D'ACTINE INTRACELLULAIRE.

1. MESURE GLOBALE AU CYTOFLUOROMETRE EN FLUX.

La concentration intracellulaire d'actine sera estimée par cytofluorométrie en flux (FACScan). Nous avons pu établir la mesure de l'actine intracytoplasmique de populations lymphocytaires d'anticorps monoclonaux couplés à la fluorescéine. Ce fluorochrome émettant une lumière verte après excitation dans l'ultraviolet permet la mesure concomitante de la ploïdie par l'iodure de propidium qui, avec la même fréquence d'excitation émet une lumière rouge. Nous étudierons la concentration d'actine dans les cellules des lignées cancéreuses à composante mégacaryocytaire. Nous corrèlerons cette concentration à la ploïdie de chaque cellule. Trois possibilités peuvent être envisagées. Tout d'abord, la découverte d'une absence d'augmentation de la concentration d'actine au cours de l'endomitose suggérerait que, globalement, la plus grande partie de l'actine est impliquée dans le phénomène d'endomitose. Par contre, une augmentation progressive ou une augmentation "saltatoire" suggèreraient qu'une faible partie seulement de l'actine serait impliquée dans l'endoréduplication.

La distribution de l'actine des mégacaryocytes provenant de la moelle osseuse de donneurs de greffe permettra de tester notre hypothèse au cours de la régulation physiologique de cellules mégacaryocytaires normales.

2. MESURE QUANTITATIVE DE L'ACTINE G ET F PAR "CELL SORTER".

L'actine se présente sous deux formes : monomère soluble (actine G) ou polymère insoluble (actine F). Les monomères d'actine sont très hétérogènes et se caractérisent surtout par les sites de liaison aux ligands (par exemple la gelsoline et la profiline pour la structure; la myosine pour la motilité et l'ATP pour apporter l'énergie contractile). Malgré cette hétérogénéité qui définit les fonctions de l'actine polymérisée, la concentration d'actine est relativement constante dans toutes les cellules. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'elle a été utilisée comme contrôle de l'expression génique d'autres molécules. Quelques anticorps monoclonaux reconnaissent différents épitopes de l'actine. Malheureusement, ils ne permettent pas de détecter réellement les sites de réaction des ligands et dès lors ne permettent pas de mesurer les différents types d'actine. Aussi, en marquant par exemple en fluorescence les ligands eux-mêmes, nous pourrons déterminer dans l'endomitose, le type chimique d'actine en cause et, par conséquent la fonction perturbée (structure, motilité ou énergie). Par ailleurs, comme nous l'avons expliqué, la forme F est en constant renouvellement par la synthèse en "arrow" et la destruction en "tail". Le contrôle de ce phénomène dynamique est encore mal connu mais peut être étudié grâce à la phalloïdine dont la propriété est de se fixer spécifiquement à une extrémité de la molécule polymérisée et de bloquer définitivement la polymérisation. La phalloïdine peut facilement être couplée à une molécule fluorescente.

2021515693

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

Dès lors, pour mettre en évidence le type précis d'actine impliqué dans la polyploïdisation, nous emploierons le tri cellulaire au cytofluoromètre (COULTER ELITE) des cellules des lignées ainsi que des cellules normales. Nous avons déjà réalisé la séparation de mégacaryocytes en diverses phases endomitotiques (2N versus >2N). Nous pourrons ainsi déterminer par électrophorèse des extraits de cellules triées en classes de ploïdie, les modifications qualitatives et quantitatives de l'actine. Ceci sera aussi réalisé sur les lignées mégacaryocytaires après stimulation par les esters du phorbol et par des cytokines telles que l'interleukine-6.

C. DETERMINATION DES ANOMALIES DE LA MATURATION MEGACARYOCYTAIRE DANS LES AFFECTIONS MALIGNES DE LA MOELLE OSSEUSE.

Par les techniques mises au point sur les lignées cellulaires et décrites plus haut, nous étudierons au fur et à mesure des pathologies rencontrées en clinique, le rôle de l'actine dans la régulation anormale des leucémies et états apparentés. Nous focaliserons nos efforts sur l'étude de la polyploïdisation classiquement décrite dans les syndromes myéloprolifératifs tels que la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle et dans les pathologies cancéreuses de l'hématopoïèse (Leucémies aiguës à caractère mégacaryocytaire).

REFERENCES

1. Chatelain, C., De Bast, M., Symann, M.: Properties of LD-CFU-M support the hypothesis of a random development of megakaryocyte ploidy from a multicompartmental stem cell system. *Blood* 72, 82a, 1988(Abstract)

2. Paulus, J.M., Prenant, M., Deschamps, J.F., Henry Amar, M.: Polyploid megakaryocytes develop randomly from a multicompartmental system of committed progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4410-4414, 1982

3. Chatelain, C., Burstein, S.A.: Fluorescence cytophotometric analysis of megakaryocytic ploidy in culture: studies of normal and thrombocytopenic mice. *Blood* 64, 1193-1199, 1984

4. Chatelain, C., De Bast, M., Symann, M.: Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M). *Blood* 72, 1187-1192, 1988

5. Laufer, J.S., von Ehrenstein, G.: Nematode development after removal of egg cytoplasm: absence of localized unbound determinants. *Science* 211, 402-405, 1981

6. Beams, H.W., Kessel, R.G.: Cytokinesis: a comparative study of cytoplasmic division in animal cells. *Am. Sci.* 64, 279-290, 1976

7. Blose, S.H.: Ten-nanometer filaments and mitosis: maintenance of structural continuity in dividing endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3372-3376, 1979

8. Chatelain, C., De Bast, M., Symann, M.: Enhancement of megakaryocyte polyploidization by actin inhibition. *Blood* 80, 497a, 1992(Abstract)

9. Cassimeris, L., Safer, D., Nachmias, V.T., Zigmond, S.H.: Thymosin β_4 sequesters the majority of G-actin in resting human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 119, 1261-1270, 1992

2021515694

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

INTRODUCTION

1. Détection de métastases occultes dans la moelle osseuse

La détection de métastases médullaires de tumeurs solides présente un intérêt pour le pronostic de la maladie néoplasique au moment du diagnostic et pour le suivi des patients traités. Diverses études ont montré la fréquence non négligeable de métastases osseuses du cancer du sein lors du diagnostic. Si plus de 40% des patientes avec un cancer du sein métastatique ont un envahissement de la moelle osseuse détecté par des méthodes habituelles (ponction-biopsie médullaire) (1,2), 28% des patientes sans métastase osseuse documentée par des critères habituels (scintigraphie et radiographie osseuses) ont un envahissement médullaire déterminé par des techniques d'immunocytochimie non spécifique (3). In vitro, on a pu révéler en culture des cellules tumorales dans les moelles osseuses histologiquement normales de patientes atteintes d'un cancer du sein (4). Des cellules tumorales peuvent être détectées dans la moelle osseuse par immunofluorescence chez 17% des patientes ayant un cancer du sein sans envahissement ganglionnaire à l'histologie (5). Plus récemment, 260 patientes atteints d'un cancer mammaire non métastatique ont subi une ponction médullaire au moment de l'exérèse de la tumeur primitive. Par une technique d'immunofluorescence, des cellules tumorales ont été identifiées dans la moelle osseuse de 44% de ces patientes (6). La détection des cellules néoplasiques apparaissait, dans cette étude, constituer un facteur de prédiction de rechute à distance de la maladie et donc un facteur de pronostic.

Le cancer bronchique à petites cellules présente des caractéristiques cliniques morphologiques et biologiques particulières. Sa propension à la dissémination précoce à distance est bien connue. La présence de cellules tumorales au niveau de la moelle osseuse peut constituer un facteur de pronostic. Notre laboratoire a montré par l'utilisation des techniques de culture clonogénique de cellules tumorales et d'immunofluorescence indirecte, l'existence d'infiltration médullaire par des cellules de carcinome anaplasique bronchique échappant à l'analyse morphologique classique (7,8,9).

2. Contamination des cellules souches périphériques

Les cellules souches du sang périphérique sont de plus en plus utilisées dans le traitement de tumeurs solides disséminées. Les premières réinfusions des cellules souches du sang circulant ont été administrées pour la reconstitution hématopoiétique potentielle chez les patients cancéreux qui ne pouvaient bénéficier d'une autogreffe de moelle osseuse en raison d'une maladie résiduelle, ou parce que la moelle était trop fibrosée pour permettre la collection d'un nombre adéquat de cellules. Le risque de contamination par des cellules tumorales est généralement considéré comme minime. Cependant, la circulation de cellules tumorales a été documentée pour le neuroblastome et le cancer du sein (10,11,12). Dans le cas du neuroblastome, la concentration de cellules néoplasiques dans le sang lors du diagnostic peut être élevée : de 2 à $1000/10^5$ cellules mononuclées. Les cellules souches du sang périphérique utilisées en vue d'autogreffe chez des patients atteints de neuroblastome sont fréquemment contaminées : parmi 8 patients étudiés, 2 présentaient des cellules tumorales au sein des cellules souches. Chez des patientes atteintes de cancer du sein, et candidates à une autogreffe, des cellules néoplasiques ont été recherchées dans les prélèvements de cellules souches périphériques. Par analyse immunocytologique, des cellules de cancer du sein sont décelées dans 4/37 leucaphérèses chez 20 patientes (11).

2021515695

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

3. Méthodes de détection

Les techniques utilisées le plus communément afin de détecter des cellules tumorales au sein des tissus hématopoïétiques font appel à toute une panoplie d'anticorps monoclonaux qui souvent ne sont pas spécifiques d'une tumeur. Cette immunodétection est assez sensible (1 cellule sur 100.000) mais peut-être subjective. Nous utiliserons la méthode d'amplification génique en chaîne (PCR) afin de déceler des contaminations possibles de la moelle osseuse ou des cellules souches périphériques par des cellules tumorales.

Dans le cas des tumeurs solides, il existe quelques rares anomalies cytogénétiques récurrentes telles que la délétion d'une partie du chromosome 3 dans le cancer bronchique anaplasique et la translocation 11;22 dans le sarcome de Ewing. En ce qui concerne les deux types de tumeurs (le cancer du sein et le cancer bronchique anaplasique) qui seront investigués, les anomalies cytogénétiques ne sont pas exploitables pour la technique de PCR. Nous rechercherons donc des gènes exprimés exclusivement par les cellules de ces tumeurs.

4. Signification de la détection de cellules tumorales

Si les techniques de PCR se sont avérées impressionnantes dans la détection de la maladie résiduelle, notamment dans la détection de translocations présentes dans certaines affections néoplasiques hématologiques, leur utilité clinique reste à démontrer.

Il faut considérer d'une part l'aspect pronostique de cette détection au moment du diagnostic d'une tumeur solide et d'autre part la signification de la détection dans les cellules souches périphériques.

En effet, ces problèmes de contamination possible des cellules souches périphériques peuvent soulever d'autres questions :

1. Faut-il détecter systématiquement des cellules néoplasiques dans les cellules souches ?

2. Quelle méthode fiable faut-il utiliser ?

3. Quelle est la signification d'une contamination éventuelle ? Faut-il modifier le traitement?

4. Faut-il purger les cellules souches des cellules tumorales (13,14) ou faut-il enrichir les cellules souches en concentrant des cellules hématopoïétiques (CD34 p.ex.) pures qui seraient moins contaminées ?

BUT DU TRAVAIL

a) Mettre au point une méthode sensible et fiable de détection par PCR de cellules de cancer mammaire et de cancer anaplasique pulmonaire parmi des cellules hématopoïétiques; cette technique devrait être plus performante que l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

b) Utiliser cette méthode afin de détecter dans la moelle osseuse des micrométastases de ce type de tumeurs lors du diagnostic ou à la rechute de la maladie.

c) Détecter la contamination possible des cellules souches hématopoiétiques circulantes par des cellules tumorales.

d) Définir la corrélation entre la détection de cellules malignes dans la moelle ou le sang et l'évolution de la maladie (en d'autre termes la rechute de la maladie néoplasique est-elle plus précoce chez les patientes présentant des métastases occultes ; faut-il traiter plus agressivement les patients porteurs de micrométastases?).

20215696

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

3. Méthodes de détection

Les techniques utilisées le plus communément afin de détecter des cellules tumorales au sein des tissus hématopoïétiques font appel à toute une panoplie d'anticorps monoclonaux qui souvent ne sont pas spécifiques d'une tumeur. Cette immunodétection est assez sensible (1 cellule sur 100.000) mais peut-être subjective. Nous utiliserons la méthode d'amplification génique en chaîne (PCR) afin de déceler des contaminations possibles de la moelle osseuse ou des cellules souches périphériques par des cellules tumorales.

Dans le cas des tumeurs solides, il existe quelques rares anomalies cytogénétiques récurrentes telles que la délétion d'une partie du chromosome 3 dans le cancer bronchique anaplasique et la translocation 11;22 dans le sarcome de Ewing. En ce qui concerne les deux types de tumeurs (le cancer du sein et le cancer bronchique anaplasique) qui seront investigués, les anomalies cytogénétiques ne sont pas exploitables pour la technique de PCR. Nous rechercherons donc des gènes exprimés exclusivement par les cellules de ces tumeurs.

4. Signification de la détection de cellules tumorales

Si les techniques de PCR se sont avérées impressionnantes dans la détection de la maladie résiduelle, notamment dans la détection de translocations présentes dans certaines affections néoplasiques hématologiques, leur utilité clinique reste à démontrer.

Il faut considérer d'une part l'aspect pronostique de cette détection au moment du diagnostic d'une tumeur solide et d'autre part la signification de la détection dans les cellules souches périphériques.

En effet, ces problèmes de contamination possible des cellules souches périphériques peuvent soulever d'autres questions :

1. Faut-il détecter systématiquement des cellules néoplasiques dans les cellules souches ?

2. Quelle méthode fiable faut-il utiliser ?

3. Quelle est la signification d'une contamination éventuelle ? Faut-il modifier le traitement?

4. Faut-il purger les cellules souches des cellules tumorales (13,14) ou faut-il enrichir les cellules souches en concentrant des cellules hématopoïétiques (CD34 p.ex.) pures qui seraient moins contaminées ?

BUT DU TRAVAIL

a) Mettre au point une méthode sensible et fiable de détection par PCR de cellules de cancer mammaire et de cancer anaplasique pulmonaire parmi des cellules hématopoïétiques; cette technique devrait être plus performante que l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

b) Utiliser cette méthode afin de détecter dans la moelle osseuse des micrométastases de ce type de tumeurs lors du diagnostic ou à la rechute de la maladie.

c) Détecter la contamination possible des cellules souches hématopoiétiques circulantes par des cellules tumorales.

d) Définir la corrélation entre la détection de cellules malignes dans la moelle ou le sang et l'évolution de la maladie (en d'autre termes la rechute de la maladie néoplasique est-elle plus précoce chez les patientes présentant des métastases occultes ; faut-il traiter plus agressivement les patients porteurs de micrométastases?).

20215156 97

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

APPROCHE EXPERIMENTALE

a) La première étape consiste à déterminer quels sont les gènes exprimés fréquemment et exclusivement par les cellules cancéreuses et non par le tissu hématopoïétique. En effet, à la différence des tumeurs hématologiques telles que les leucémies et les lymphomes, il n'y a pas de translocations récurrentes qui puissent être exploitées. L'expression de différents gènes dont la séquence est connue sera analysée dans des lignées tumorales de cancer du sein et du poumon. Ils seront choisis a priori en considérant que leur expression doit être spécifique d'une tumeur solide et non décelable dans un tissu hématopoiétique. Pour les cancers du sein par exemple, on peut retenir les gènes encodant la mucine exprimée par plus de 90% des cancers du sein, l'oncogène c-Erb b2/Neu, les gènes encodant les récepteurs aux oestrogènes et progestérone. Pour le cancer du poumon, un antigène exprimé par le tissu cérébral et les cellules de cancer anaplasique pulmonaire a été cloné (15) et pourrait être utilisé dans la détection de ces cellules néoplasiques.

b) Une série de lignées tumorales sera étudiée afin de sélectionner les gènes exprimés fréquemment par ces lignées. Le cDNA synthétisé à partir d'ARN est amplifié par PCR. Les cellules tumorales de lignées seront ensuite diluées dans du tissu hématopoïétique sain afin de déterminer la limite de détection des cellules tumorales (1/100-1/1.000.000). Afin d'augmenter la sensibilité de la PCR, les amorces utilisées seront doubles : un aliquot du premier produit de PCR sera utilisé pour une deuxième PCR en utilisant des amorces situées "à l'intérieur" des amorces de la première PCR. Donc, cette seconde PCR sera enrichie en séquence recherchée suite à la PCR initiale. Les amorces de la deuxième PCR ("nested primers") peuvent éliminer le background et permettent d'obtenir un meilleur produit final. Des contrôles doivent être régulièrement utilisés car la technique peut être grevée d'une fréquence non négligeable de faux positifs. Par ailleurs, il faut s'assurer que des cellules médullaires non hématologiques telles que les fibroblastes ou les cellules endothéliales ne produisent pas les gènes utilisés pour la détection de cellules tumorales. Les avantages de la PCR sont la rapidité de la procédure et la possibilité de détecter des cellules malignes à une haute dilution (dans le cas de leucémies par exemple, 1 cellule sur 10^6 serait détectable (16)).

c) L'évolution clinique des patients présentant ou ne présentant pas de métastases médullaires sera suivie. Nous pouvons ainsi préciser l'importance de cette détection dans le pronostic et la thérapeutique de la maladie.

REFERENCES

1. Ingle et al. Cancer 41:670-674, 1978
2. Ellis et al. Cancer 63 : 2509-2514, 1989
3. Redding et al. Lancet 2:1271-1274, 1983
4. Mann et al. Exp. Hematol. 14:541 (abstr. 771), 1986
5. Porro et al. Cancer 61:2407-2411, 1988
6. Diel et al. J. Clin. Oncol. 10:1534-1539, 1992
7. Lebacq-Verheyden. Eur. J. Clin. Oncol. 24:137-145, 1988
8. Canon et al. Eur. J. Clin. Oncol. 24:147-150, 1988
9. Humblet, Symann. Path. Biol. 36:83-85, 1988
10. Moss et al. Blood 76: 1879-1883, 1990
11. Moss, Ross. J. Hematother. 1:225-232, 1992
12. Ross et al. Breast Cancer Res. Treat. 19:171, 1991
13. Lebacq-Verheyden et al. in Mc Vie, Dalesio, Smith eds. EORTC monographs. NY. Raven Press 19-28, 1984.
14. Humblet et al. Cancer Res. 49 : 5058-5061, 1989
15. Szabo et al. Cell 67:325-333, 1991
16. d'Auriol et al. Leukemia 3:155-158, 19892

20215698

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

DETECTION PAR AMPLIFICATION GENIQUE DES MICROMETASTASES MEDULLAIRES ET DE CONTAMINATION DE CELLULES SOUCHES DU SANG PERIPHERIQUE PAR DES CELLULES DE TUMEURS SOLIDES.

Notre laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années à l'autogreffe de moelle osseuse après chimiothérapie intensive dans le traitement des tumeurs solides. Il était logique de chercher à déceler un envahissement médullaire pour prévenir une contamination possible d'un prélèvement de moelle utilisé en vue d'une autogreffe. Les cellules de cancer bronchique anaplasique à petites cellules ont été détectées au sein de la moelle par des anticorps monoclonaux et par la technique de culture clonogénique de cellules tumorales (1,2,3). Ces contaminations médullaires posent le problème de l'utilité de la "purge du greffon" (4,5).

Actuellement, les cellules souches hématopoïétiques du sang périphérique tendent à remplacer les cellules médullaires dans la greffe autologue surtout lorsque la moelle est contaminée par des cellules néoplasiques ou lorsque celle-ci est fibrosée ou appauvrie suite aux chimio- et radiothérapies. Beaucoup de nos patients bénéficient actuellement de ce type de greffe. L'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques dont nous avons acquis l'expérience clinique (6) a facilité la transplantation de cellules souches circulantes. Enfin, notre laboratoire possède une expertise dans l'utilisation de la technique d'amplification génique (7). Nous proposons d'utiliser cette technique afin de détecter des cellules tumorales dans la moelle et le sang de patients atteints de cancer bronchique anaplasique et de cancer du sein.

1. Lebacq-Verheyden AM. et al. Eur. J. Clin. Oncol. 24:137-145, 1988.
2. Canon JL et al. Eur. J. Clin. Oncol. 24:147-150, 1988.
3. Humblet Y, Symann M. Path. Biol. 36:83-85, 1988.
4. Lebacq-Verheyden et al. in Mc Vie, Dalesio, Smith eds. EORTC monographs. NY. Raven Press 19-28, 1984.
5. Humblet et al. Cancer Res. 49 : 5058-5061, 1989
6. D'Hondt V. et al. Proc. Asco 1992
7. Guillaume Th. et al. Cancer Res. Soumis pour publication.

2021515699

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

ETUDE DE LA RESTAURATION IMMUNITAIRE APRES TRANSPLANTATION DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES CHEZ LA SOURIS

Description succinte du projet de recherches (2 ou 3 pages maximum)

L'exposé du projet de recherches que l'on envisage de réaliser doit être précédé d'une brève description de l'hypothèse de travail.

Dans l'éventualité où ce projet devrait s'étendre sur plusieurs exercices, il y a lieu d'en indiquer clairement les phases successives avec leur répartitions dans le temps ainsi que les corrélations entre l'objectif à atteindre et les crédits sollicités.

Indiquez le nombre d'années académiques pour lesquelles ce projet est sollicité : 2 ans

INTRODUCTION

La chimiothérapie intensive suivie d'autogreffe de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoiétiques du sang périphérique permet d'obtenir des rémissions complètes. Toutefois, il existe un taux élevé de rechutes particulièrement précoces. L'éradication de la maladie résiduelle est d'autant plus difficile que la période post-greffe s'accompagne d'une immunodépression. Nous avons pu investiguer certains signaux de transduction de l'activation précoce des lymphocytes T CD4+ ainsi que différentes voies de stimulation de ces lymphocytes chez des patients autogreffés (1,2). Ces travaux commencent à nous révéler une partie des mécanismes impliqués dans le déficit immunitaire post-autogreffe. Nous sommes souvent confrontés dans l'analyse de l'investigation in vitro de l'immunité post-greffe de ces patients à une variabilité des résultats due vraisemblablement à l'hétérogénéité de la population étudiée. Ces patients ont des tumeurs différentes et par conséquent ont reçu des chimiothérapies différentes avec leurs effets myélosuppresseurs propres. Nous proposons d'utiliser un modèle animal de transplantation de moelle osseuse entre souris syngéniques afin de pouvoir disséquer de manière plus systématique l'immunité post-greffe. Au cours des dernières années, la connaissance des mécanismes d'activation précoce des lymphocytes T s'est étendue.

Le déficit immunitaire après autogreffe de moelle osseuse atteint principalement les lymphocytes T. Jusqu'il y a quelques années, on pouvait résumer ce déficit cellulaire en quelques observations classiques : une réduction des taux relatifs et absolus de lymphocytes T CD4+ dans le sang périphérique associée à un taux normal voire augmenté du nombre de lymphocytes CD8+, un défaut de prolifération des lymphocytes T et une diminution de la sécrétion d'interleukine-2. Nous avons étudié par cytofluorométrie en flux l'augmentation de calcium intracellulaire au niveau des lymphocytes CD4+ après stimulation par la concanavaline A par l'utilisation concomitante d'un colorant spécifique du calcium, le fluo-3 et un anticorps monoclonal reconnaissant la sous-population CD4+ (1). Physiologiquement, l'activation des lymphocytes T entraîne suite à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate par la phospholipase C, la formation de 2 produits : l'inositol 1,4,5-triphosphate qui va provoquer une augmentation de calcium intracellulaire et le diacyl-glycerol qui active la protéine kinase C. Chez les patients autogreffés depuis moins d'un an, on observe une augmentation plus faible du taux de calcium intracellulaire au niveau des lymphocytes T CD4+ par rapport à celle observée chez des sujets contrôles. La diminution semble s'expliquer par une réduction du nombre de cellules capables d'augmenter leur taux de calcium intracellulaire normalement. Chez les patients greffés depuis plus d'un an, le taux de calcium intracellulaire moyen est plus faible dans les lymphocytes T activés par rapport à un groupe de sujets sains mais cette différence n'est pas statistiquement significative. Ceci suggère qu'il existe une anomalie dans la formation des signaux de transduction précoce après stimulation et que ce phénomène tend à régresser à distance de la greffe. Nous avons également étudié la production d'IL-2 après stimulation par PHA, PHA + PMA, PMA + un ionophore du calcium, et PMA + anti CD28 (2). Ces différents stimuli induisent une production d'interleukine-2 inférieure à celle observée dans un groupe d'individus normaux. La production d'ARNm d'IL-2 apparaît aussi réduite. Ceci indique que différentes voies d'activation des lymphocytes T ne fonctionnent pas normalement après greffe de moelle osseuse. Par contre, le récepteur de l'IL-2 est normalement exprimé par les lymphocytes T après activation (3,4) et ceux-ci répondent à l'adjonction d'IL-2 in vitro ce qui suggère que cette voie d'activation reste

2021515700

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

Suite page 3

préservée. La réduction de la production d'IL-2 en présence de PMA et d'anti-CD28 correspond à l'observation récente d'une réduction de l'expression de l'antigène CD28 par les lymphocytes TCD3+ des patients autogreffés (5) et la diminution de prolifération en présence d'anti-CD28. La quantité de cytokine produite par les lymphocytes CD4+ durant une stimulation antigénique est contrôlée par des signaux co-stimulants dépendant des cellules présentant l'antigène. L'expression de la molécule B7, le ligand du CD28, apparaît critique dans la capacité de co-stimuler les lymphocytes T.

Le déficit de prolifération des lymphocytes T post-greffe ressemble au phénomène d'anergie clonale, modèle faisant appel au concept de co-stimulation par deux signaux nécessaires à l'activation de lymphocytes T. Ce modèle a été développé notamment pour expliquer la non-réponse immunitaire à un auto-antigène. Il existe de plus en plus d'arguments pour penser que l'interaction B7-CD28 constitue le deuxième signal co-stimulant des lymphocytes T. Dans le cas de l'autogreffe, la présence de monocytes allogéniques obtenus chez des sujets sains ne semble pas améliorer la prolifération et la sécrétion d'IL-2 (6). Nous pensons que la diminution du CD28 à la surface des lymphocytes T et/ou l'anomalie de cette voie d'activation peut induire un phénomène semblable d'anergie au niveau des cellules T.

L'activation des lymphocytes T menant à la production de cytokines est un phénomène dont les mécanismes sont peu à peu élucidés. Le récepteur de l'antigène est constitué par une association hautement complexe d'oligomères comprenant au moins 7 protéines membranaires distinctes. Le récepteur T doit d'abord reconnaître et se lier à son ligand. Cette liaison se traduit ensuite en signaux intracellulaires résultant finalement en une réponse appropriée. La spécificité à l'antigène est définie par deux chaînes variables α et β. D'autres molécules non variables dont les fonctions restent imprécises sont associées aux récepteurs T : CD3 (gamma, δ, ϵ), ζ et η . Ces différentes chaînes semblent faire le lien entre la reconnaissance de l'antigène et les transferts des signaux de transduction intracellulaires (7). Le dimère ζ apparaît important dans la transduction des signaux. Son domaine cytoplasmique a la capacité de transmettre les signaux indépendamment des autres chaînes du récepteur T. La stimulation du récepteur T active la protéine tyrosine kinase entraînant la phosphorylation de multiples protéines cellulaires. L'inhibition de ce phénomène provoque une diminution de la production d'IL-2. Deux protéine tyrosine kinases, particulières, fyn et lck, sont impliquées dans la fonction du récepteur T et jouent un rôle dans la transmission de l'information.

Notre projet est focalisé sur ces aspects d'activation des lymphocytes T, afin de distinguer les molécules défectueuses dans la chaîne de transmission des signaux et peut-être de pouvoir y remédier et d'ainsi corriger l'immunité post-greffe.

BUT DU PROJET

Etudier l'activation des lymphocytes T après greffe de moelle syngénique chez les souris sous différents aspects:

1. Mesurer la présence des molécules associées au complexe récepteur T et leur rôle dans le déficit immunitaire post-greffe.

2. Analyser la voie d'activation lymphocytaire T par le CD28 après greffe de moelle.

3. Analyser l'expression des tyrosine kinases p56 lck et p59 fyn par les populations CD4+ et CD8+

2021515701

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

APPROCHE EXPERIMENTALE

La transplantation de moelle entre souris syngéniques se fera selon des protocoles tout à fait classique. Après irradiation, les souris recevront la moelle par voie intraveineuse. Les souris receveuses seront sacrifiées tous les 15 jours afin d'étudier :

1. la répartition des sous-populations de lymphocytes T au niveau du sang périphérique et la prolifération par incorporation de [^{3}H]-thymidine suite à la stimulation par différents mitogène dont l'anti-CD28.

2. La présence des protéines associées au complexe récepteur T au niveau des lymphocytes CD4+ post-greffe. Ceux-ci sont isolés afin d'obtenir une population pure. Ces cellules sont marquées radioactivement puis lysées. Le complexe récepteur T est précipité à partir du surnageant des cellules lysées avec un anticorps anti-CD3 et séparé sur gel de polyacrylamide à 2 dimensions. La protéine ζ peut également être visualisée par immunoblot. Les protéines du surnageant des cellules lysées sont séparées par électrophorèse transférées sur membrane, puis détectées avec anticorps anti-ζ.

3. Les protéines lck et fyn. Celles-ci seront également analysées par immunoblot, à partir des lymphocytes CD4 isolés. Par ailleurs, l'activité kinase de ces protéines sera étudiée. Ces protéine kinases peuvent être obtenues à partir des lysats cellulaires en utilisant un anticorps polyclonal formé contre ces protéines. Les complexes immuns obtenus sont récoltés et placés en présence d'ATP marqué pour la réaction de kinase. Les polypeptides phosphorylés sont ensuite séparés sur gel. L'activité kinase peut être quantifiée par densitométrie en comparaison avec celle des cellules de sujets normaux.

REFERENCES

1. Guillaume et al. Brit. J. Haematol. 1993. Sous presse.
2. Guillaume et al. Blood 80 (suppl.1) 140a, 1992.
3. Bosly et al. Exp. Hematol. 15:1048-1054, 1987.
4. Merluzzi et al. J. Immunol. 134:2426-2430, 1985
5. Kormehl et al. Blood 80 (suppl.1), 271a, 1992.
6. Cayeux et al. Blood. 74:2270-2277, 1989.
7. Chan et al. Curr. Opinion Immunol. 4:246-251, 1992.

2021515702

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

UTILISATION THERAPEUTIQUE DE TRANSFERT DE GENE PAR VECTEUR RETROVIRAL DANS DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES CIRCULANTES: ETABLISSEMENT D'UN MODELE PRE-CLINIQUE MURIN ET DEFINITION DES CONDITIONS IN VITRO DE TRANSFECTION PAR RETROVIRUS DES CELLULES SOUCHES HUMAINES.

Nous avons publié la première étude clinique prospective et randomisée concernant l'intérêt de l'intensification thérapeutique sous couvert d'autogreffe de moelle osseuse dans le cancer anaplasique à petites cellules (1) et défini les conditions de concentration des cellules souches hématopoïétiques médullaires (2). Après autogreffe, il existe un déficit immunitaire pouvant persister plus d'un an. Nous avons démontré que la capacité de prolifération des lymphocytes T réduite après greffe peut être restaurée in vitro par l'Interleukine-2 (IL-2) (3). Nous avons également observé que la production d'IL-2 par les lymphocytes T est diminuée de même que la production de l'ARNm de l'IL-2 par rapport aux contrôles normaux (4). De même l'élévation du calcium intra-cellulaire suivant stimulation par concanavalin A est réduite (5). Nous avons ensuite montré que l'administration systémique d'IL-2 ne corrige que partiellement ces déficits chez les greffés (6).

Les cellules souches hématopoïétiques périphériques permettent une reprise après greffe plus rapide que les cellules médullaires. Notre équipe cherche à optimaliser les schémas d'administration de facteurs de croissance après chimiothérapie permettant d'obtenir les meilleures collectes de cellules souches périphériques par leucaphérèse (7). Les caractéristiques biologiques des cellules souches et leur abondance en font des cibles idéales pour un transfert de gène par vecteurs rétroviraux. Dans un modèle murin préclinique, nous tenterons de corriger le déficit immunitaire après greffe en introduisant, grâce à un rétrovirus, le gène de l'IL-2 ou du CD4 dans des cellules souches périphériques murines. Nous définirons également *in vitro* les conditions optimales de transfection par rétrovirus de cellules souches périphériques humaines collectées en vue d'une greffe.

REFERENCES

1. Humblet Y, Symann M. et al.
   Late intensification chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in selected small cell carcinoma of the lung : a randomized study.
   J. Clin. Oncol. 1987; 5:1864-1873.
2. Humblet Y. et al.
   Concentration of bone marrow progenitor cells by separation on a percoll gradient using the haemonetic model 30.
   Bone Marrow Transplant. 1988; 3:63-67.
3. Bosly A and Symann M.
   Recombinant human interleukin-2 restores in vitro T cell colonies formation by peripheral blood mononuclear cells after autologous bone marrow transplantation.
   Exp. Hematol. 1987; 15:1048-1054.
4. Guillaume T, Hamdan O, Sekhavat M, Staquet P, Bosly A, Humblet Y, Doyen C, Symann M. T-cell unresponsiveness in recipients of autologous bone marrow transplants (ABMT) : Analysis of defective signal transduction and IL-2 message transcription.
   Blood 80 (suppl. 1) : 140a, 1992
5. Guillaume T, Hamdan O, Staquet P, Sekhavat M, Bosly A, Humblet Y, Doyen C, Coiffier B, Felman P, Symann M.
   Blunted rise in intracellular calcium in CD4+ T cells in response to mitogen following autologous bone marrow transplantation.
   British Journal of Hematology, 1993, In press.
6. Bosly A, Guillaume T, Brice P, Humblet Y, Staquet P, Doyen C, Chatelain B, Franks C, Gisselbrecht C, Symann M.
   Effects of escalating doses of recombinant human IL-2 in correcting functionnal T-cell defects following autologous bone marrow transplantation for lymphoma and solid tumors.
   Exp. Hematol. 20: 962-968, 1992.
7. Guillaume T, D'Hondt V, Symann M.
   Peripheral blood stem cell harvesting with IL-3.
   Int. J. Cell Cloning. 1993. In press

2021515703

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

L'existence d'une relation dose-réponse en chimiothérapie anticancéreuse est le point de départ des essais cliniques d'escalade de dose, encore appelés "intensification thérapeutique". La toxicité limitante de la plupart des agents cytostatiques étant la myélotoxicité, les intensifications thérapeutiques se pratiquent sous le couvert d'auto- ou d'allo-greffe de cellules souches hématopoïétiques afin de prévenir une aplasie médullaire irréversible. Notre équipe est la première à avoir publié une étude clinique prospective et randomisée concernant l'intérêt de l'intensification thérapeutique dans le cancer bronchique anaplasique à petites cellules (1) et aujourd'hui les chimiothérapies intensives avec autogreffe de cellules souches hématopoïétiques sont activement investiguées dans le traitement des leucémies, des lymphomes, des cancers du sein, du testicule ainsi que de l'ovaire (2).

La chimiothérapie intensive suivie de greffe de cellules souches hématopoïétiques qui ne comprennent qu'un nombre limité de précurseurs lymphoïdes a pour conséquence d'induire chez les malades une immunosuppression prolongée, de plus d'un an, contribuant vraisemblablement aux infections opportunistes et aux rechutes tumorales fréquemment rencontrées chez les malades ainsi traités. Notre équipe a contribué à la caractérisation de ce déficit immunitaire (diminution du pourcentage et du nombre absolu de cellules T CD4+, augmentation du nombre absolu et relatif des cellules NK CD56+, déficit lymphoprolifératif T, déficit de production d'IL-2) et au développement de ses moyens de correction (3,4). L'utilisation systémique d'IL-2 comme immunothérapie adjuvante après intensification thérapeutique et greffe de cellules souches hématopoïétiques produit des effets biologiques intéressants sur les cellules NK CD56+ mais peu marqués en ce qui concerne les lymphocytes T (5). En raison de la toxicité de l'IL-2, ce traitement n'est pas sans risque et son application au long cours est difficilement pratiquable.

On trouve chez l'homme comme chez la souris des cellules souches capables de repeupler le système hématopoïétique après agression léthale, dans le foie de foetus, dans le sang de cordon ombilical, dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique de l'adulte (6). L'utilisation de cellules souches hématopoïétiques du sang périphérique est aujourd'hui activement investiguée (projet interuniversitaire FRSM 74.583.92) en raison de leurs propriétés intéressantes en ce qui concerne la cinétique de régénération hématopoïétique après greffe ou en raison de leur collecte facile par leucaphérèses pratiquées en période de régénération hématopoïétique post-chimiothérapique après administration de facteurs de croissance hématopoïétiques. Les cellules souches ainsi collectées présentent une propriété biologique intéressante supplémentaire : une haute proportion d'entre elles est activement engagée dans le cycle de prolifération cellulaire ce qui en fait des cibles idéales pour transfection par vecteur rétroviral (7) contenant par exemple le gène de l'IL-2 ou le gène du CD4.

Le choix des cellules souches périphériques pour tentative de correction du déficit immunitaire post-greffe par transfert de gène apparaît encore plus judicieux si l'on considère que les leucaphérèses pratiquées après chimiothérapie et stimulation hématopoïétique collectent une fraction déjà concentrée *in vivo* (jusqu'à 20% des cellules mononucléées ainsi collectées sont CD34+) (8). De plus ces progéniteurs hématopoïétiques sont relativement plus mûrs que ceux de la moelle osseuse, ce qui explique qu'une bonne proportion d'entre eux est appelée à s'éteindre dans les mois qui suivent la greffe. Il s'agit là d'une propriété intéressante à exploiter si l'on souhaite que l'expression du gène greffé s'amenuise avec le temps après la greffe. En revanche, la question de la reprise hématopoïétique à long terme dans les cas de greffes pratiquées avec les seules cellules souches hématopoïétiques périphériques n'est pas encore résolue (9) et la contribution de ce type de greffon à l'hématopoïèse post-greffe devrait trouver une réponse au travers du type de manipulation que nous envisageons.

Dans une étude clinique réalisée par notre groupe (5), l'administration d'IL-2 augmente l'activité des cellules NK CD56+ jusqu'à 2 semaines après arrêt de la thérapeutique mais ne restaure pas de manière significative les capacités de prolifération des lymphocytes T, contrairement à ce que nous avions observé *in vitro* (3). On peut espérer que la transfection d'un gène d'IL-2 ou de CD4 dans des cellules souches périphériques greffées entraînera un effet biologique et clinique plus marqué car le récepteur de l'IL-2 est normalement exprimé à la surface des lymphocytes T qui réapparaissent dans le sang après transplantation de cellules souches. Par ailleurs, l'importance de la majoration de l'activité cytotoxique non MHC-restreinte dans un contexte de maladie résiduelle n'est pas clairement établie; toutefois pour plusieurs types de

2021515704

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

tumeurs, l'utilisation d'IL-2 associée ou non à l'administration de lymphocyte activated killer (LAK) ou tumor infiltrating lymphocyte (TIL) s'est révélée capable d'induire des regressions tumorales (10). Il apparaît que l'IL-2 joue un rôle central dans le déficit immunitaire après autogreffe et dans l'immunothérapie adoptive anticancéreuse, ce qui justifie pleinement l'emploi de cette cytokine dans notre modèle.

Les lymphocytes T helper, principaux producteurs d'IL-2, sont classiquement caractérisés par leur phénotype CD4. La population CD4+ est nettement réduite chez les patients autogreffés et cette diminution du nombre absolu de cellules CD4+ explique en partie le déficit de secrétion d'IL-2. Le rôle de la molécule d'adhésion CD4 n'est pas entièrement élucidé. Son intégrité apparaît nécessaire pour une réponse immunitaire normale, car elle interagit avec certaines tyrosine kinases liées au complexe récepteur T. Elle permettrait d'amplifier la production d'IL-2. De plus, la présence à faible densité de l'antigène CD4 décrite à la surface des cellules pluripotentes hématopoiétiques suggère que cette molécule joue également un rôle dans l'hématopoïèse au sens large. Les effets de la transfection du gène encodant la molécule CD4 dans les cellules souches hématopoiétiques seront également très intéressants à investiguer.

BUT DU PROJET

L'objectif de ce travail est d'une part de développer un modèle pré-clinique de transfection de cellules souches hématopoïétiques murines avec des vecteurs rétroviraux contenant le gène de l'IL-2 ou du CD4 afin de tester les aspects de faisabilité, de toxicité et le retentissement de ces manipulations sur la reconstitution immunitaire et la régénération hématopoïétique au long cours après greffe. Les vecteurs seront, si nécessaire, rendus plus contrôlables par l'adjonction d'un gène-suicide comme, par exemple, le gène de la cytosine déaminase qui convertit la 5-fluorocytosine non toxique en 5-fluorouracil cytotoxique (11). Ceci permettrait d'éliminer les cellules transfectées en cas d'accident non anticipé.

D'autre part, le projet a pour but la production de vecteurs rétroviraux totalement dépourvus de particules virales recombinantes et de tester la possibilité de transfecter, *in vitro*, des cellules souches périphériques humaines collectées dans des conditions similaires à celles d'un protocole clinique.

Une éventuelle application clinique ferait bien sûr l'objet d'une demande d'avenant au présent projet et ne serait envisagée qu'après obtention préalable des autorisations requises pour une telle expérience.

APPROCHE EXPERIMENTALE

A. ETABLISSEMENT D'UN MODELE MURIN

1. Production de rétrovirus contenant le cDNA de l'IL-2 ou du CD4

a) **Construction des vecteurs rétroviraux**
Le plasmide M5-néo contenant un gène de résistance à la généticine (G418) est un excellent vecteur pour l'expression de gène dans les cellules hématopoïétiques (12). Le cDNA de l'IL-2 ou du CD4 sera inséré dans le site du clonage EcoRI de M5-néo. Les séquences de polyadénylation de ces cDNA seront préalablement excisées car elles provoquent une chute drastique du taux de rétrovirus produit. L'orientation correcte du cDNA sera vérifiée en digérant le plasmide par enzyme de restriction.

b) **Production de particules rétrovirales**
Le plasmide sera transfecté dans la lignée d'emballage ecotropique GP+E86 (13) par la technique classique de co-précipitation au phosphate de calcium. Cette lignée produit, *in trans*, les protéines dérivées des gènes *gag*, *pol*, et *env* nécessaires à la production de particules rétrovirales. Le surnageant rétroviral produit par cette lignée servira à l'infection de la lignée amphotropique GP+envAm12.

2021515705

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

c) **Détermination du titre rétroviral**
Les cellules NIH 3T3 seront infectées avec le surnageant viral produit par cellules d'emballage GP+E86 ou GP+envAm12. Seules les NIH 3T3 ayant intégré le virus et donc le gène de résistance au G418, survivront après introduction de l'antibiotique dans le milieu. Le titre viral correspond au nombre de colonies formées par millilitre de surnageant viral.

d) **Recherche de rétrovirus recombinant infectieux**
Les surnageants de NIH 3T3 infectées par rétrovirus et sélectionnées par G418 serviront à infecter des NIH 3T3 fraîches et celles-ci seront à nouveau sélectionnées avec du G418. En l'absence de rétrovirus recombinant ces cellules ne survivront pas.

2. Etablissement du modèle animal

a) **Infection des cellules souches périphériques**
Nous utiliserons des souris C3H/HeJ car cette race a été fréquemment utilisée dans les expériences de transfert de gène par rétrovirus en raison du faible risque d'apparition de rétrovirus recombinant xénotrope chez ces animaux. Les cellules souches hématopoïétiques de ces souris seront collectées après chimiothérapie et rhG-CSF par section brachiale ou ponction cardiaque sous anesthésie générale (14). Ces cellules seront préstimulées pendant 48 heures par de l'interleukine-6 et du Stem Cell Factor pour augmenter la mise en cycle cellulaire (15) et mises ensuite durant 48 h en présence de la lignée productrice de virus préalablement irradiée. Les cellules hématopoïétiques non adhérentes seront injectées à des souris syngéniques irradiées à dose léthale.

b) **Suivi après greffe**
A court terme, nous surveillerons les paramètres hématologiques (globules blancs et plaquettes) par ponction rétro-orbitaire. La persistance du gène rétroviral dans les cellules hématopoïétiques périphériques et médullaires sera evaluée par polymerase chain reaction et son expression par Elisa pour l'IL-2 et par cytométrie de flux pour le CD4. A plus long terme, la survenue éventuelle de lymphomes suite à une stimulation du type autocrine par l'IL-2 sera évaluée par suivi clinique et examen anatomopathologique des rates et moelles des animaux sacrifiés à des temps déterminés de l'expérience.

B. DEFINITION DES CONDITIONS D'INFECTION IN VITRO DES CELLULES SOUCHES PERIPHERIQUES HUMAINES

Nous disposons d'une lignée cellulaire (PA317) produisant des rétrovirus (N2) conférant la résistance au G418 à de hauts titres et déjà utilisés dans plusieurs protocoles cliniques (16). Le titre rétroviral sera estimé et l'absence de virus recombinant sera évaluée. Des cellules souches périphériques humaines fraîchement collectées après chimiothérapie suivie de facteur de croissance seront infectées par le surnageant viral filtré car la technique de co-culture n'est pas applicable en clinique en raison des risques de contamination par les cellules murines. Les cellules souches périphériques seront donc exposées au surnageant viral durant des temps à déterminer et l'infection des cellules sera controlée par culture clonale en méthylcellulose avec ou sans G418. Les colonies résistantes seront isolées et la présence du gène de résistance au G418 sera certifiée par polymerase chain reaction.

REFERENCES

1. Humblet Y, Symann M. et al. J. Clin. Oncol. 5:1864-1873, 1987
2. Armitage JO and Antman K. "High Dose Cancer Therapy: Pharmacology, Hematopoietins, Stem cells", Williams and Wilkins, eds. Baltimore, Maryland USA, 1992
3. Bosly et al. Exp. Hematol. 15 : 1048-1054, 1987

2021515706

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

4. Cayeux et al. Blood 74:2270-2277, 1989
5. Bosly et al. Exp. Hematol. 20:962-968, 1992
6. Symann. Fetal hemopoiesis in diffusion chamber cultures. Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur 1979.
7. Bregni M, Gianni A et al. Blood 80 (6) 1418-1422, 1992
8. Bender JG. Int. J. Cell Cloning 10 : 79-84, 1992
9. Lowry P. et al. Exp. Hematol. 20 : 937-942, 1992
10. Rosenberg SA et al. J. Exp. Med. 161:1169, 1985
11. Mullen CA, Blaese M. PNAS USA 89:33, 1992
12. Laker C. et al. PNAS USA 84:8458-8462, 1987
13. Markowitz D. Virology 167:400-407, 1988
14. Molineux G, Dexter M. et al. Blood 76 (10) 2153-2158, 1990
15. Luskey BD et al. Blood 80 (2) 396-402, 1992
16. Dick JE et al. Blood 78 (3) 624-634, 1992

2021515707

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

MECANISMES DE POLYPLOIDISATION MEGACARYOCYTAIRE DANS DES LIGNEES CELLULAIRES LEUCEMIQUES.

INTRODUCTION

Parmi les affections malignes de la moelle osseuse, les syndromes myéloprolifératifs (maladie de Vaquez, leucémie myéloïde chronique, thrombocytémie essentielle et splénomégalie myéloïde), résultent d'une transformation maligne de la cellule souche hématopoïétique et ont en commun une prolifération accrue sans blocage de maturation des trois lignées myéloïdes, une hyperuricémie, une splénomégalie, une évolution terminale fréquente en myélofibrose et en leucémie aiguë.

Le caractère monoclonal de la prolifération cellulaire affectant les trois lignées médullaires a été clairement établi par l'étude des femmes noires hétérozygotes pour les isoenzymes de la G-6-P-D dans la maladie de Vaquez, la leucémie myéloïde chronique (LMC), la thrombocytémie essentielle (TE), et la splénomégalie myéloïde (populations érythrocytaire, granulocytaire, plaquettaire, toutes porteuses de la même unique isoenzyme).

Dans les syndromes myéloprolifératifs, la lignée plaquettaire est souvent affectée soit par les anomalies des fonctions plaquettaires soit par le nombre excessif des plaquettes. Cependant, il existe une hétérogénéité au sein des différents syndromes. En effet, alors que dans la leucémie myéloïde chronique, le volume mégacaryocytaire est petit ou normal, dans la thrombocytémie essentielle, la caractéristique médullaire est une augmentation de la ploïdie mégacaryocytaire.

Sur base de l'étude morphométrique des mégacaryocytes de souris, Harker a montré en 1968 une corrélation inverse entre le volume mégacaryocytaire moyen et la concentration plaquettaire (1,2). Après induction d'une thrombopénie, le volume mégacaryocytaire moyen augmente. Par contre, suite à l'hypertransfusion de plaquettes, la taille des mégacaryocytes diminue. Cette régulation est réalisée par une substance humorale appelée "thrombopoïétine" dont la nature reste à découvrir. Plusieurs cytokines ont une action thrombopoïétique (IL-6, IL-11, LIF ...). Par ailleurs, l'oncogène mpl issu d'un virus responsable chez la souris d'un syndrome myéloprolifératif avec fibrose médullaire code pour une protéine présentant des ressemblances avec certains membres de la famille des récepteurs de croissance hématopoïétiques. L'homologue humain de cet oncogène a été cloné (3). Les lignées mégacaryocytaires connues expriment intensément cet oncogène suggérant qu'il code pour un récepteur à un facteur très spécifique de la mégacaryocytopoïèse (4). Chez l'homme une corrélation similaire a été observée en condition normale. En pathologie, cette corrélation entre le volume mégacaryocytaire moyen et la concentration plaquettaire se vérifie d'une façon assez surprenante dans la leucémie myéloïde chronique alors que dans la thrombocytémie essentielle le volume mégacaryocytaire moyen élevé semble échapper au contrôle thrombopoïétique. Ces données ont été confirmées en cytofluorométrie en flux par Tomer (5) ainsi que par notre équipe.

Il est impossible d'obtenir une lignée continue à partir de cellules normales. La leucémie myéloïde chronique est particulièrement intéressante puisqu'elle présente des troubles de prolifération couplée à une régulation normale mégacaryocytaire. Nous avons établi dans notre laboratoire quatre lignées nouvelles issues de deux patients atteints de leucémie myéloïde chronique (lignées DB et DL) et de deux patients atteints de thrombocytémie essentielle (lignées AA et DD). L'étude morphométrique des mégacaryocytes de ces patients est en accord avec la théorie de Harker. Ces lignées sont établies et repiquées depuis plusieurs mois dans un milieu supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal.

2021515708

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

Par l'étude de ces lignées cellulaires issues de deux affections malignes prolifératives ou le phénomène de polyploïdisation est normal (LMC) ou anormal (TE), nous proposons d'étudier les anomalies du contrôle de l'endomitose mégacaryocytaire.

BUT DU TRAVAIL

Notre projet a pour but de déterminer les anomalies de la polyploïdisation entraînant l'hyperplaquettose de la TE à partir des lignées continues humaines que nous avons établies. La comparaison se fera avec nos lignées continues issues de patients atteints de LMC où le contrôle de la polyploïdisation mégacaryocytaire est normale. Nous avons montré que l'absence de polymérisation de l'actine induit la polyploïdisation des mégacaryocytes. Les esters de phorbol et certaines cytokines augmentent la ploïdie mégacaryocytaire, nous voulons démontrer que leur action sur ces lignées s'exerce sur le métabolisme de l'actine.

APPROCHE EXPERIMENTALE

1. **Développement de nouvelles lignées continues mégacaryocytaires**
Nous avons donc établi des lignées continues à partir de moelle de patients atteints de LMC et de thrombocytémie essentielle. D'autres affections malignes de la moelle osseuse s'accompagnent de perturbation de la mégacaryocytopoïèse (la maladie de Vaquez, la splénomégalie myéloïde, les myélodysplasies et certaines leucémies aigues à caractère mégacaryocytaire). Parallèlement à la caractérisation des lignées déjà établies, nous poursuivrons le développement d'autres lignées au fur et à mesure des opportunités de la clinique.

2. **Caractérisation des lignées établies**

a. **Cytologie**
Les quatres lignées seront analysées du point de vue cytologique par la coloration classique de May-Grünwald Giemsa (MGG). Ensuite, la présence de caractéristiques mégacaryocytaires telles que la présence de membranes de démarcation, des granules denses et granules α ainsi que le contenu en péroxydase plaquettaire seront étudiés par microscopie électronique.

b. **Cytochimie**
Les examens cytochimiques nous permettront de détecter en microscopie optique l'activité de la myélopéroxydase, des phosphatases acides, des estérases (alpha-naphtyl, alpha-naphtyl-butyrate, chloro-naphtyl-ASD acétate, estérases) ainsi que la positivité pour la réaction de PAS (Periodic Acid Schiff).

c. **Immunologie**
La mesure de ploïdie (coloration à l'iodure de propidium) est réalisée en cytofluorométrie en flux. Le contenu protéique pourra être simultanément quantifié par un immunomarquage direct à la fluorescéine. La cytofluorométrie en flux nous permettra de mesurer l'expression des protéines plaquettaires. C'est ainsi que notre étude portera sur la mise en évidence des glycoprotéines membranaires : la GPIIb/IIIa et la GPIb ainsi que sur les facteurs VIII et de von Willebrand. Par ailleurs, les contenus de granules alpha en PDGF, fibrinogène, facteurs de von Willebrand, β-TG et PF4 seront mesurés de même que le contenu des granules denses.

d. **Taille et distribution de ploïdie à l'étape basal**
Par morphométrie (Harker, 1968), nous pourrons estimer la taille des cellules et, par cytofluorométrie, la taille et la ploïdie des noyaux cellulaires.

e. **Caractéristique génétique**
Une analyse cytogénétique révèlera le caryotype de nos cellules ainsi nous confirmerons la nature maligne de nos cellules et l'absence d'anomalie supplémentaire. Les deux patients atteints de LMC et dont les lignées sont issues ont un réarrangement du bcr.

20215709

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

3. **Caractérisation en culture et étude de la polyploïdisation**

a. **Taux de prolifération en culture**

Nous établirons le taux de prolifération en culture en calculant l'augmentation cellulaire en fonction du temps et en mesurant le taux d'incorporation de la thymidine tritiée.

b. **Culture sans sérum**

Mises en présence d'un milieu synthétique de base, beaucoup de cellules ne font que survivre. Le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, le plus souvent fourni par le sérum. Cependant, le sérum a plusieurs inconvénients car il se présente sous forme de mixture très complexe dont les composants sont mal définis. C'est pourquoi, il s'avère intéressant de remplacer le sérum par un mélange connu de facteurs de croissance (milieu défini).

c. **Réponse aux cytokines**

Parmi les cytokines, l'IL-6, l'IL-11, le LIF, l'érythropoïétine et l'IL-3 ont la capacité d'augmenter la ploïdie des mégacaryocytes normaux. Nous étudierons la ploïdie des cellules de nos lignées suite à l'adjonction de ces facteurs. Une éventuelle synergie sera étudiée par l'addition de combinaison de ces facteurs.

Nous étudierons l'expression de l'homologue v-mpl dans les lignées que nous avons établies et sa modulation par les facteurs de croissance. Les oligonucléotides antisens seront utilisés pour définir le rôle de cette nouvelle molécule dans la lignée mégacaryocytaire (ploïdie en cytofluorométrie en flux). Cette technologie sera aussi appliquée à l'étude de la modulation de l'expression des gènes codant pour les récepteurs aux cytokines connus pour leur action stimulante de l'endomitose (IL-6R, LIF-R, IL-11-R...).

4. **Etude de l'actine**

Nos études chez la souris suggèrent que l'absence de polymérisation de l'actine entraîne l'endomitose mégacaryocytaire (6). Nous avons confirmé ces données chez l'homme par l'étude de lignées leucémiques à caractéristique mégacaryocytaire (DAMI, MEG01, HEL, K562). Nous avons remarqué après quatre jours de culture une augmentation de la taille et de la ploïdie de ces cellules suite à l'adjonction d'ester de phorbol (stimulant non spécifique des récepteurs aux facteurs de croissance) et/ou de cytochalasine B (inhibiteur de la polymérisation de l'actine). Ces expériences seront également réalisées sur nos propres lignées. Le rôle physiologique de l'actine dans l'induction de la polyploïdisation doit encore être démontré. Dans ce but, nous comptons mesurer l'actine sous ses différentes formes :

a. **Mesure globale au cytofluoromètre en flux.**

Nous avons mis au point la mesure globable de l'actine sur des populations lymphocytaires par marquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'actine. Les quantités globales d'actine seront mesurées sur les quatres lignées mégacaryocytaires à notre disposition avant et après stimulation au PMA et à la cytochalasine B. Une corrélation avec la ploïdie de ces cellules pourra être effectuée par marquage concomittant des cellules à l'iodure de propidium. Dans ce cas, trois possibilités peuvent être envisagées. Tout d'abord, une absence d'augmentation de l'actine permettrait de postuler que la plus grande partie de l'actine est impliquée. Ensuite, une augmentation "saltatoire" ou progressive suggèrerait qu'une faible partie seulement de l'actine serait impliquée dans l'endoréduplication.

b. **Mesure qualitative de l'actine G et de l'actine F**

L'actine se présente sous deux formes : l'actine G monomérique et soluble et l'actine F polymérisée et insoluble. L'actine G tout comme l'actine F ont la capacité de se lier à toute une série de ligand. La profiline se lie à l'actine G et gène la polymérisation.

La gelsoline rompt les filaments d'actine F et se lie à une des extrémités. Ces deux protéines rendent compte de la structure de la cellule. La tropomyosine se lie latéralement le long du filament et la myosine se déplace le long de celui-ci. Ce sont elles qui assurent la motilité de la cellule. Enfin, la villine et l'alpha-actinine connectent les filaments entre eux formant ainsi les trames ou réseaux.

La concentration d'actine est relativement constante dans toutes les cellules. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'elle a été utilisée comme contrôle de l'expression génique d'autres molécules. Quelques anticorps monoclonaux reconnaissent différents épitopes de l'actine. Malheureusement, ils ne permettent pas réellement de déceler les sites de liaison aux différents ligands et dès lors de mettre en évidence les différents types d'actine. C'est par

2021515710

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000

marquage fluorescent que nous pourrons mettre en évidence dans l'endomitose le type d'actine et donc la fonction perturbée (motilité, structure par exemple,...). De plus, la phalloïdine qui se lie spécifiquement au filament d'actine permettra d'analyser le processus dynamique de la formation d'actine. Dès lors de façon à mettre en évidence le type précis d'actine, nous emploierons le tri cellulaire au cytofluoromètre en flux (Coulter Elite) sur les lignées ainsi que sur les cellules normales. Cette technique a déjà été mise au point dans notre laboratoire. Nous avons déjà séparé des mégacaryocytes en diverses phases mitotiques (2N et > 2 N). Après tri de ces cellules en fonction des classes de ploïdie, nous pourrons par électrophorèse déterminer les modifications quantitatives et qualitatives de l'actine.

c. **Modification de l'expression du gène de l'actine**

L'expression du gène de l'actine est un phénomène modulable. Les agents adrénergiques et l'héparine conduisent à la synthèse d'actine (7,8,9,10). Nous testerons leurs effets sur l'induction de polyploïdisation de nos lignées cellulaires. Certains facteurs de transcription contrôlent la synthèse d'actine. Par addition d'oligonucléotides antisens au milieu de culture, nous bloquerons ces facteurs de transcription et étudierons leurs effets sur la ploïdie des cellules des lignées en culture.

REFERENCE

1. Harker LA: Megakaryocyte quantitation. J Clin Invest 47:452, 1968
2. Harker LA: Kinetics of thrombopoiesis. J Clin Invest 47:458, 1968
3. Vigon: PNAS 89:5640-5644, 1992
4. Wendling F.: Proceedings of the ASH. Blood 80, 1992(Abstract)
5. Tomer A, Harker LA, Burstein SA: Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. Blood 71:1244, 1988
6. Chatelain, C., De Bast, M., Symann, M.: Enhancement of megakaryocyte polyploidization by actin inhibition. Blood 80, 497a, 1992(Abstract)
7. Bishopric NH, Sato B, Webster KA: β-Adrenergic regulation of a myocardial actin gene via a cyclic AMP-independent pathway. J Biol Chem 267:20932, 1992
8. Desmoulière A, Rubbia-Brandt L, Grau G, Gabbiani G: Heparin induces α-smooth muscle actin expression in cultured fibroblasts and in granulation tissue myofibroblasts. Lab Invest 67:716, 1992
9. Bishopric NH, Jayasena V, Webster KA: Positive regulation of the skeletal α-actin gene by Fos and Jun in cardiac myocytes. J Biol Chem 267:25535, 1992
10. Muthuchamy M, Pajak L, Wieczorek DF: Induction of endogenous myosin light chain 1 and cardiac α-actin expression in L6E9 cells by MyoD1. J Biol Chem 267:18728, 1992

20215157 11

Source: https://www.industrydocuments.ucsf.edu/docs/tghm0000